XVI.

Aus dem Laboratorium für medicinische Chemie in Bern.

1.

Ueber das Hämin.

Von

M. Nencki und N. Sieber.

Die durch Extraction der rothen Blutkörperchen mit salzsäurehaltigem Amylalkohol erhaltenen Häminkrystalle, deren Zusammensetzung wir entsprechend der Formel: $(C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3)_4C_5H_{12}O$ gefunden haben ¹⁾, im Luftbade bis zu constantem Gewichte bei 130 bis 135° getrocknet, verlieren den Amylalkohol vollständig. Bei dieser Temperatur entweicht aber keine Salzsäure, wie überhaupt das Aussehen der Krystalle keine Veränderung erleidet, nur werden sie stark hygroskopisch. Sie sind dann entsprechend der Formel $C_{32}H_{31}ClN_4FeO_3$ zusammengesetzt. Durch Auflösen der bei 130 bis 135° getrockneten Präparate in verdünnter Natronlauge, Fällen des Filtrates mit verdünnter Salzsäure, Auswaschen des Niederschlages bis zur Entfernung des Chlors wird daraus reines Hämatin erhalten, dessen Analysen der früher von uns ermittelten Formel: $C_{32}H_{32}N_4FeO_4$ entsprechen, wie dies aus folgenden Analysen hervorgeht:

0,291 g der nach dem früher beschriebenen Verfahren aus Rinderblut dargestellten Häminkrystalle, zunächst über SO_4H_2 , sodann bei 130° bis zu constantem Gewichte getrocknet, gaben 0,671 g CO_2 und 0,1428 g H_2O oder 62,88 Proc. C und 5,04 Proc. H.

0,268 g gaben 22 ccm N-Gas bei 14° T. und 715 mm Bst. oder 9,08 Proc. N.

0,3718 g des gleichen Präparates in zugeschmolzenem Rohre mit Salpetersäure und salpetersaurem Silber 5 Stunden lang auf 200° erhitzt gaben 0,0801 g AgCl und 0,0476 g Fe_2O_3 oder 5,33 Proc. Cl und 8,94 Proc. Fe.

Der Rest des Präparates wurde in verdünnter Natronlauge ge-

1) Siehe dieses Archiv. XVIII. Bd.

löst, filtrirt, aus dem Filtrate mit Salzsäure ausgefällt, ausgewaschen, bei 110° getrocknet und analysirt.

0,2395 g der Substanz, in offenem Rohr im Sauerstoffstrome verbrannt gaben 0,5705 g CO₂ und 0,1196 g H₂O oder 64,96 Proc. C und 5,54 Proc. H. Die im Schiffchen hinterbliebene Asche wurde in Salzsäure gelöst und aus der Lösung das Eisen mittelst Ammoniak abgeschieden. Gefunden 0,0312 g Fe₂O₃ oder 9,12 Proc. Fe. 0,2489 g gaben 22 ccm N-Gas bei 16,5° T. und 705 mm Bst. = 9,53 Proc. N.

Die Häminformel C₃₂H₃₁ClN₄FeO₃. Aequivalent 610,37 verlangt 62,91 Proc. C, 5,08 Proc. H, 5,79 Proc. Cl, 9,17 Proc. Fe und 9,17 Proc. N. Die Hämatinformel C₃₂H₃₂N₄FeO₄. Aequivalent 592 verlangt C 64,86, H 5,40 N und Fe 9,46 Proc.

Ein anderes, ebenso wie das vorherige aus Rinderblut dargestelltes und bei 130° getrocknetes Häminpräparat ergab folgende Zahlen: 0,2882 g der Substanz mit chromsaurem Blei verbrannt gaben 0,0671 g CO₂ und 0,1395 g H₂O oder 62,81 Proc. C und 5,37 Proc. H.

0,3522 g gaben 0,0783 g AgCl und 0,0447 g Fe₂O₃ oder 5,49 Proc. Cl und 8,88 Proc. Fe. Ein anderer Theil der analysirten Krystalle wurde in Hämatin verwandelt, das bei 110° getrocknet und in offenem Rohr verbrannt folgende Zahlen ergab: 0,2696 g gaben 0,6381 g CO₂, 0,1308 g H₂O und 0,0353 g Fe₂O₃ oder 64,60 Proc. C, 5,39 Proc. H und 9,16 Proc. Fe.

Die Zahlen der Analysen bestätigen also unsere frühere Annahme, dass bei der Umwandlung der Häminkrystalle in das Hämatin durch Auflösen der ersteren in Alkalien Salzsäure abgespalten und dafür Wasser in das Molekül aufgenommen wird. Möglich, ja sogar wahrscheinlich ist es aber, dass das Chlor in den Häminkrystallen nicht an Wasserstoff, sondern an Kohlenstoff oder Eisen gebunden ist und dass die Umwandlung des Hämins in Hämatin in der Ersetzung des Chlors durch Hydroxyl besteht.

Obgleich durch diese Analysen die empirische Formel des Hämins und des Hämatins festgestellt ist, so suchten wir doch durch Darstellung neuer Derivate des Hämatins noch weitere Beweise für die Richtigkeit derselben. Das Nächstliegende war, das Hämin oder Hämatin zu acetyliren, wobei auch die Anzahl der in dem Hämatin enthaltenen Hydroxyle eruiert werden könnte. Die Versuche nach dieser Richtung hin fielen jedoch nicht günstig aus, indem beim Kochen des Hämins oder Hämatins mit Essigsäureanhydrid eine partielle Ammoniakabspaltung stattzufinden scheint. Die Häminkrystalle lösen sich in etwa 100 Theilen kochenden Eisessigs auf, bedeutend mehr in kochendem Essigsäureanhydrid, so dass in der Siedhitze

etwa 7 Gewichtstheile des Anhydrids zur Auflösung von einem Gewichtstheile der Häminkrystalle genügen. Es wurden nun in einem Versuche 10 g Häminkrystalle mit dem 9fachen Gewichte des Anhydrids eine Stunde lang am Rückflusskühler gekocht und heiss filtrirt. Aus dem Filtrate schieden sich beim Erkalten über SO_4H_2 concentrisch gruppirte Krystalle von grosser Unbeständigkeit aus. Man konnte nämlich unter dem Mikroskope verfolgen, wie die Krystalle durch Zusatz von absolutem Alkohol, Eisessig oder Wasser sich zersetzten und in amorphe, körnige Gebilde verwandelt wurden. Wir sind deshalb geneigt, dieselben als eine Doppelverbindung von Essigsäureanhydrid mit Hämin anzusehen. Die Krystalle wurden abfiltrirt, mit etwas Essigsäureanhydrid nachgewaschen, sodann zwischen Fliesspapier möglichst abgepresst und über SO_4H_2 getrocknet.

Das Gewicht der Substanz, die nach dem Trocknen amorph war, wurde erst nach mehrwöchentlichem Stehen über SO_4H_2 constant. Die Elementaranalysen dieses Productes ergaben folgende Zahlen: 0,2795 g der Substanz im offenen Rohre, im Sauerstoffstrome mit chromsaurem Blei verbrannt gaben 0,6449 g CO_2 , 0,1301 g H_2O und 0,0333 g Fe_2O_3 oder 62,92 Proc. C, 5,17 Proc. H und 8,35 Proc. Fe.

0,4109 g des gleichen Präparates mit Salpetersäure und salpetersaurem Silber im zugeschmolzenen Rohre erhitzt gaben 0,093 g AgCl und 0,0506 g Fe_2O_3 oder 5,59 Proc. Cl und 8,62 Proc. Fe.

0,2657 g des gleichen Präparates gaben 19 cem N-Gas bei 718 Bst. und 17,0 T = 7,8 Proc. N.

Am nächsten stehen die erhaltenen Zahlen der Formel eines monoacetylirten Hämins = $\text{C}_{32}\text{H}_{30}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O})\text{ClN}_4\text{FeO}_3$ Aequivalent 652,37, welche verlangt: C 62,54 Proc., H 5,21 Proc., Cl 5,43 Proc., N und Fe 8,58 Proc. Am wenigsten mit dieser Formel stimmt der gefundene Stickstoffgehalt überein, welcher, wie man sieht, merklich niedriger gefunden wurde. Noch weniger übereinstimmende Zahlen erzielten wir bei der Analyse eines Productes, das durch Kochen von Hämatin mit Essigsäureanhydrid erhalten wurde. Hämatin löst sich in Anhydrid weniger als das Hämin, weshalb wir 8 g des Hämatins mit dem 20fachen Gewichte Anhydrid am Rückflusskühler eine Stunde lang kochten. Aus der heiss filtrirten Lösung schied sich theilweise beim Erkalten, theilweise beim Verdunsten über SO_4H_2 ein amorphes, körniges Product aus, das abfiltrirt und ebenfalls nur über SO_4H_2 bis zu constantem Gewichte getrocknet wurde. Die Elementaranalyse dieses Productes zeigte, dass in demselben das Verhältniss von Eisen zu Stickstoff nicht mehr wie 1:4 war. Der Stickstoffgehalt ist erheblich niedriger geworden.

0,2837 g der Substanz gaben 0,6513 g CO_2 , 0,1325 g H_2O und 0,0354 g Fe_2O_3 oder 62,61 Proc. C, 5,18 Proc. H und 8,37 Proc. Fe. 0,4324 g der Substanz gaben 26 ccm N-Gas bei $13,5^\circ \text{T.}$ und 720 mm Bst. oder 6,72 Proc. N.

So weit sind unsere Untersuchungen gediehen, als die Entdeckung einerseits des Parahämoglobins, andererseits der Farbstoffe der melanotischen Sarkome unseren Arbeiten eine andere Richtung gab. Wir werden das Studium des Hämins, sobald es unsere Zeit erlaubt, wieder aufnehmen. Wir sehen uns nur genöthigt, für jetzt einer abfälligen Kritik, welche unserer Untersuchung des Blutfarbstoffes von Seite Hoppe-Seyler's zu Theil geworden ist, an dieser Stelle entgegenzutreten. Die bezügliche Publication findet sich in den diesjährigen Berliner chemischen Berichten. XVIII. Bd. S. 601 und ist uns insofern willkommen, als die sachlichen Angaben Hoppe-Seyler's eine weitere Bestätigung der von uns aufgestellten Hämatin-formel sind. Seine Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffbestimmungen im Hämatin entsprechen nämlich der von uns aufgestellten Formel. Nur der Eisengehalt, den Hoppe-Seyler blos aus der bei der Verbrennung zurückgebliebenen Schiffebenasche bestimmte, ist von ihm zu niedrig gefunden worden (8,82 Proc. statt 9,46 Proc.). Hoppe-Seyler theilt nun mit, dass jetzt auch er höhere Eisenprocente im Hämatin als die von ihm früher angegebenen findet, aber selbst bei Vermeidung der Veraschung noch nicht so hohe Zahlen, als wie sie unsere Formel verlangt. — Wir fanden im Mittel 9,3 Proc. Fe. — Da nun das Eisen ausschliesslich dem Hämatin zukommt und jede andere Beimengung den Eisengehalt herabdrückt, so ist zu erwarten, dass, sobald Hoppe-Seyler das Hämatin noch reiner darstellen lernt, auch er den Eisengehalt gleich wie wir finden wird.

Was wir vorausgesagt haben ¹⁾, nämlich, dass gleich wie das aus Amylalkohol auskrystallisirte Häminamylalkohol, so auch das aus Eisessig auskrystallisirte Hämin Essigsäure enthalten wird, hat Hoppe-Seyler jetzt bestätigt. Da die Häminkrystalle verschiedener Blutarten und auf verschiedene Weise gereinigt stets die gleiche procentische Zusammensetzung hatten, entsprechend der Formel: $(\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{ClN}_4\text{FeO}_3)_4\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$, so war die Annahme wohl gerechtfertigt, dass das Hämin im bestimmten Verhältnisse mit Amylalkohol krystallisire. Wenn, wie dies Hoppe-Seyler meint, die Krystalle Portionen der Mutterlauge, in der sie entstehen, in sich einschliessen, so sollte doch der Gehalt an Amylalkohol in ihnen und dann auch ihre procentische Zusammensetzung wechselnd sein. — Nach unserer Ansicht ist die

1) Siehe dieses Archiv. XVIII. Bd. S. 411.

Extraction des Hämins mit siedendem Amylalkohol das bequemste, billigste und vor Allem das reinste Präparat liefernde Verfahren. Hoppe-Seyler findet es lästig und zwar wegen der schnellen Filtration der siedenden amylalkoholischen Lösung. — Jeder Andere muss aber gerade das schnelle Filtriren als einen wesentlichen Vortheil der Methode ansehen, da man dann nur kurze Zeit den unangenehmen Dämpfen von Amylalkohol ausgesetzt ist. Nun, wenn Hoppe-Seyler die Extraction mit Eisessig vorzieht, so möchten wir ihn bitten, dass er den Gehalt an Essigsäure in seinen Häminkrystallen auch dann bestimme, wenn sie nur über SO_4H_2 oder bei 100° T. getrocknet sind. — Vielleicht geschieht auch hier das Einschliessen der Mutterlange stets in constantem Verhältniss.

Die Besorgniss Hoppe-Seyler's, dass, weil Amylalkohol, mit Salzsäure erwärmt, sich schwach roth färbt, die niederfallenden Krystalle deshalb von dieser Färbung etwas aufnehmen, theilen wir nicht. Die Spuren des entstehenden Farbstoffes sind im Amyl- sowie Aethylalkohol und Aether leicht löslich und bei dem langen Auswaschen der Krystalle mit diesen Flüssigkeiten ist die Besorgniss, es möchte etwas von dem Farbstoff den Häminkrystallen anhaften und die Zahlen der Elementaranalysen beeinflussen, einfach eine gesuchte Prüderie. Man kann übrigens auch mit weniger Salzsäure gute Ausbeute an Häminkrystallen erhalten. Wir nehmen bei unseren Darstellungen auf 400 g Blutpulver und 1600 ccm Amylalkohol nur 20 ccm Salzsäure von 1,12 spec. Gewicht.

Hinsichtlich der Bildung des Hämatoporphyrins scheint es, dass wir wirklich in den gleichen Irrthum wie früher Hoppe-Seyler verfallen sind. Zweifellos entsteht aus den Häminkrystallen beim Auflösen der letzteren in concentrirter Schwefelsäure unter Abspaltung des Eisens ein sauerstoffreicherer Product, wie dies aus den Elementaranalysen hervorgeht. Die Annahme aber, dass beim Auflösen des Hämins in concentrirter Schwefelsäure atmosphärischer Sauerstoff absorbirt werde, haben wir durch einen besonders angestellten Versuch nicht bestätigen können. Es wurden in ein Eudiometer über Quecksilber 0,4699 g reines, bei 130° getrocknetes Hämin in ein Gläschen gebracht, hierauf 9,48 ccm O_2 auf 0° und 760 mm Bst. reducirt hinzugelassen und nach dem Ablesen des Volums 50 ccm concentrirte Schwefelsäure zugesetzt. Beim Schütteln der Flüssigkeit über Quecksilber löste sich der grösste Theil des Hämins auf. Nach mehrstündigem Stehen wurde dann das Eudiometer in viel Wasser übergebracht und nach Entfernung der Schwefelsäure das Gas noch mit Alkali geschüttelt. Das Volumen des Sauerstoffes im Eudio-

meter war jetzt = 9,5 ccm (auf 0° und 760 mm Bst. reducirt). Demnach keine Absorption. Beim Auflösen der Häminkrystalle in concentrirter Schwefelsäure wird nur Salzsäure, aber weder Kohlensäure, noch Wasserstoff frei.

Wir haben die von uns für das Hämatoporphyrin aufgestellte Formel aus den Zahlen der Elementaranalysen berechnet. In zwei von verschiedener Darstellung herrührenden Präparaten haben wir gefunden:

C 69,57 und 69,44 Proc.

H 6,20 6,13 "

N 9,67, 9,83 und 10,17 Proc.

Die von uns aufgestellte Formel $C_{32}H_{32}N_4O_5$ verlangt: C 69,55 Proc., H 5,80 Proc., N 10,14 Proc., O 14,51 Proc.

Noch besser stimmen die erhaltenen Zahlen zu der Formel: $C_{32}H_{34}N_4O_5$, welche verlangt: C 69,31 Proc., H 6,13 Proc. und N 10,10 Proc.

Sie unterscheidet sich von der obigen nur durch ein Plus von H_2 . Die Entstehung des Hämatoporphyrin aus Hämatin wäre danach sehr einfach:

Nur war es uns unwahrscheinlich, dass gerade unter dem Einfluss von concentrirter Schwefelsäure, eines wasserentziehenden Agens, das Hämatin Eisen verlieren und Wasser in das Molekül aufnehmen sollte. Möglich, dass die Einwirkung der concentrirten Schwefelsäure auf das Hämin resp. Hämatin in der Abspaltung von Eisen und Ersatz desselben durch Wasserstoff besteht, nach der Gleichung: $C_{32}H_{32}N_4FeO_4 + SO_4H_2 = C_{32}H_{34}N_4O_4 + SO_4Fe$ und erst beim Auflösen des Productes in Alkalien, wie dies in unseren Versuchen der Fall war, eine Oxydation von $C_{32}H_{34}N_4O_4$ zu $C_{32}H_{34}N_4O_5$ stattfindet.

Die Angabe Hoppe-Seyler's, dass Hämatoporphyrin durch Einwirkung schwacher Säuren aus seinem hypothetischen Hämochromogen bei Abwesenheit von Sauerstoff gebildet werde, konnten wir nicht bestätigen, obgleich wir mehrfach den Versuch wiederholt haben. In einem besonders construirten Apparate hat Herr Dr. Lachowicz nach stundenlangem Durchleiten von Wasserstoff durch Hämoglobinlösungen, die danach völlig reducirt waren, sodann Vermischen derselben mit Säure unter Luftabschluss weder Hämatoporphyrin, noch Eisenoxydulsalz erhalten. Durch reducirende Substanzen wird übrigens Hämatoporphyrin selbst verändert. Wir haben Hämatoporphyrin in 0,5proc. Natronlauge gelöst, die Lösung auf dem

Wasserbade erwärmt und mit kleinen Portionen 10proc. Natriumamalgams reducirt. Nach 2 Tagen wurde die alkalische Flüssigkeit filtrirt, die Lösung mit Salzsäure ausgefällt und das abgeschiedene braunrothe Product bis zum Verschwinden der Chlorreaction im Filtrate gewaschen. Das noch feuchte Product löste sich leicht in absolutem Alkohol auf und zeigte im Spectrum drei Absorptionsstreifen, ähnlich denen des Hexahydrohämatoporphyrins.

Aus der alkoholischen Lösung konnte die Substanz durch Wasserzusatz vollkommen ausgefällt werden. Sie wurde hierauf abfiltrirt, zwischen Fliesspapier abgepresst und sodann bei 110—115° bis zu constantem Gewichte getrocknet. Das Product war aschefrei und ergab bei der Elementaranalyse folgende Zahlen: 0,2335 g der Substanz gaben 0,5792 g CO₂ und 0,1372 g H oder 67,65 Proc. C und 6,52 Proc. H. 0,2165 g gaben 17,7 ccm N-Gas bei 714 mm Bst. und 22° T., entsprechend 8,68 Proc. N.

Das Product enthält also mehr Wasserstoff als das Hämatoporphyrin, dagegen weniger Kohlenstoff und namentlich weniger Stickstoff. Alkalische Reductionsmittel, zumal in der Wärme, eignen sich zur Untersuchung der Häminderivate weniger, da mit der Reduction gleichzeitig auch tiefere Zersetzung, wahrscheinlich unter Ammoniakspaltung, stattfindet. Wir haben deshalb zu der Bereitung des Hexahydrohämatoporphyrins Zinn und Salzsäure vorgezogen. Es ist interessant und eine weitere Bestätigung für die Richtigkeit der von uns für das Hexahydrohämatoporphyrin aufgestellten Formel, dass Hoppe-Seyler durch Einwirkung von Natronlauge und Zinkstaub auf das Hämatin den gleichen Körper und von der gleichen procentischen Zusammensetzung erhalten hat. Wenn er trotzdem auch diesen Körper nicht für eine reine Substanz hält, so können wir ihn daran nicht hindern. Es ist sonst in der Chemie üblich, Substanzen, die, auf ganz verschiedenen Wegen erhalten, gleiche Eigenschaften und gleiche Zusammensetzung haben, als das gleiche chemische Individuum zu betrachten. Auch durch Natriumamalgam wird das Hämatin in das Hexahydrohämatoporphyrin übergeführt, nur ist es schwieriger, dasselbe rein zu erhalten und namentlich von dem unveränderten Hämatin zu trennen. Bei dieser Gelegenheit möchten wir bemerken, dass das mittelst Zinn und Salzsäure erhaltene Hexahydrohämatoporphyrin, das in Alkalien unlöslich ist, längere Zeit mit verdünnter Natronlauge gekocht, darin löslich wird.

Ein Zeichen grosser Ueberschätzung ist die Behauptung Hoppe-Seyler's, dass er zuerst die Blutfarbstoffe, ihre Zusammensetzung

und ihre Verwandlung beschrieben habe. Nicht er hat die Hämoglobin- oder Häminkrystalle entdeckt. Dass seine Angaben über die Zusammensetzung und Verwandlung des Hämins falsch sind, gibt er ja selbst zu, indem er den Eisengehalt des Hämatins jetzt höher findet und nachträglich entdeckt, dass seine Häminkrystalle Essigsäure enthalten.

Mag Hoppe-Seyler schliesslich leugnen, dass durch die Ermittlung der wahren Zusammensetzung des Hämatins die Erkenntniss der genetischen Beziehung zwischen dem Blutfarbstoff und Gallenfarbstoff gefunden sei. Wir wollen ihm auch dieses Vergnügen lassen. Andere und wir denken zwar anders darüber.

Bern, im August 1885.

2.

Ueber das Parahämoglobin.

Von

M. Nencki.

Die in Nachfolgendem zu beschreibenden Versuche habe ich gemeinschaftlich zum Theil mit Dr. N. Sieber, zum Theil mit Dr. Br. Lachowicz ausgeführt. Sie bilden die Fortsetzung unserer Untersuchung über den Blutfarbstoff; denn nachdem durch dieselben die Zusammensetzung des farbigen Bestandtheiles der Hämoglobine ermittelt wurde, war die nächstliegende Frage die, wie der Farbstoff mit dem Eiweiss zu Hämoglobin verbunden sei. Seit der Entdeckung der Hämoglobinkrystalle sind darüber verschiedene Ansichten ausgesprochen worden, welche bis auf den heutigen Tag sich schroff gegenüberstehen. So hat noch vor Kurzem H. Struve¹⁾ die schon früher von Lehmann vertretene Ansicht zu der seinigen gemacht. Nach H. Struve sind die Hämoglobinkrystalle „Krystalle einer farblosen eiweissartigen Substanz, die bisher noch nicht im reinen Zustande dargestellt werden konnten, sondern immer von kleinen, aber überaus gleichen Quantitäten eines oder verschiedener Blutfarbstoffe mechanisch gefärbt sind“. Aehnliches gibt auch Stanislaus von Stein an. Durch Thierkohle entfärbtes, verdünntes Blut liefere farblose Krystalle, welche dieselben Formen wie die gefärbten zeigen. Hoppe-Seyler betrachtet das Hämoglobin als eine chemische Verbindung

1) Mémoires de l'Académie des sciences de St. Petersbourg. T. XXXII. No. 7. 1884.